

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets⁶ : A61K 31/725</p>		<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 96/30026 (43) Date de publication internationale: 3 octobre 1996 (03.10.96)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00458</p>		<p>(81) Etats désignés: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p>	
<p>(22) Date de dépôt international: 27 mars 1996 (27.03.96)</p>			
<p>(30) Données relatives à la priorité: 95/03565 27 mars 1995 (27.03.95) FR</p>		<p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; Avenue Tony-Garnier, F-69365 Lyon Cédex 07 (FR).</p>			
<p>(71) Déposant (<i>FR seulement</i>): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).</p>			
<p>(72) Inventeurs; et</p>			
<p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): GYSIN, Jürg [CH/FR]; Les Roches, F-69670 Vaugneray (FR). POUVELLE, Bruno [FR/FR]; 6, avenue de la Victoire, F-69260 Charbonnières (FR). SCHERF, Artur [DE/FR]; 1 bis, rue Emile-Dutaux, F-75015 Paris (FR).</p>			
<p>(74) Mandataire: ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).</p>			

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR PREVENTING AND TREATING MALARIA, BASED ON A MEMBER OF THE CHONDROITIN-GLYCOSAMINOGLYCAN FAMILY

(54) Titre: COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES POUR LE PREVENTION ET LE TRAITEMENT DU PALUDISME, A BASE D'UN MEMBRE DE LA FAMILLE DES CHONDROITINE-GLYCOSAMINOGLYCANES

(57) Abstract

A pharmaceutical composition for treating or preventing malaria-related complications, characterised in that it contains a physiologically active agent consisting of chondroitin-4-sulphate.

(57) Abrégé

Composition pharmaceutique pour le traitement ou la prévention des complications dues au paludisme, caractérisée en ce qu'elle contient un agent physiologiquement actif constitué par du chondroïtine-4 sulfate.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettone	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES POUR LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT DU PALUDISME, A BASE D'UN MEMBRE DE LA FAMILLE DES CHONDROÏTINE-GLYCOSAMINOGLYCANES

La présente invention concerne le paludisme, notamment des moyens pour la thérapie ou la prévention du paludisme, et plus particulièrement lorsque l'agent étiologique responsable de la maladie est Plasmodium falciparum.

La séquestration des érythrocytes infectés par Plasmodium falciparum dans le réseau microvasculaire des différents organes joue un rôle essentiel dans la pathogénicité des infections sévères par Plasmodium falciparum. (1, 2, 3). Une étude histopathologique a, en effet, révélé que des séquestrations de Plasmodium falciparum étaient parfois observées dans la micro-vascularisation cérébrale chez Saimiri sciureus, l'un des primates utilisés de façon fréquente à titre de modèles animaux pour l'étude de l'évolution chez l'homme du paludisme, plus particulièrement des formes de cette maladie induites par des parasites du type Plasmodium falciparum.

Il a en effet été constaté que des complications neurologiques avec issue fatale peuvent se produire chez le primate Saimiri sciureus karyotype 14-7, parasité par différents isolats de P.falciparum et qu'elles peuvent survenir à différents moments de l'évolution parasitaire, sans apparente corrélation avec la durée ou le degré de parasitémie, ce qui est comparable aux observations faites chez l'homme, en particulier lorsque celui-ci est atteint de neuropaludisme ou sujet à des accès pernicieux.

Les études histopathologiques réalisées chez les Saimiri ayant succombé à un accès pernicieux ont montré une grande similitude avec celles qui ont été décrites chez l'homme. Nos résultats montrent que les obstructions vasculaires au niveau des microvaisseaux du cerveau sont discontinues et que leur topographie est très variable chez cet hôte, ce qui est similaire aux observations plus récemment faites chez l'homme ayant succombé à un neuropaludisme et celles faites dans le modèle expérimental de paludisme cérébral Macaca mulatta / P.coatneyi. Chez le Saimiri

comme chez l'homme, les obstructions vasculaires sont souvent plus importantes et parfois presque exclusivement localisées au niveau du cervelet, entraînant des gênes circulatoires du flux sanguin importantes, qui peuvent expliquer à elles seules l'état comateux et la mort du patient ou de l'animal.

La réactivité de divers types cellulaires avec des érythrocytes infectés par Plasmodium falciparum, et la capacité d'un certain nombre d'anticorps monoclonaux décrits dans la littérature (2,11) d'interférer avec cette réactivité, est à l'origine de l'hypothèse déjà formulée que ce processus serait médié, d'une part, par des ligands d'adhérence spécifiques présents à la surface de érythrocytes infectés et, d'autre part, par des récepteurs qui seraient exprimés à la surface des cellules endothéliales (2, 4, 5, 6, 7).

L'invention est basée sur l'identification d'un nouveau récepteur d'adhérence qui est exprimé à la surface des cellules endothéliales provenant de micro-vaisseaux de cerveaux de Saimiri et constitué notamment par de la chondroïtine-4 sulfate. Dans le cours des expériences qui ont conduit à la présente invention, deux anticorps monoclonaux dirigés contre ce nouveau récepteur ont été développés. Ils se sont révélés capables de bloquer efficacement l'adhérence d'érythrocytes infectés par plusieurs souches du parasite à des cellules endothéliales, que celles-ci soient d'origine cérébrale de Saimiri ou pulmonaire humaine. La capacité de ces anticorps monoclonaux à s'attacher aux cellules endothéliales a également été inhibée de façon spécifique par la chondroïtine-4-sulfate (CSA). De même, le prétraitement des cellules endothéliales avec la chondroïtinase ABC et AC abolit la capacité des érythrocytes infectés à s'attacher à ces cellules endothéliales, d'où la conclusion à laquelle les inventeurs ont abouti, à savoir qu'un récepteur endothérial pour l'adhésion des érythrocytes infectés par Plasmodium falciparum, contenait un membre de la famille des chondroïtine-glycosaminoglycans, plus particulièrement la chondroïtine-4-sulfate (CSA).

De fait, les inventeurs ont montré que l'administration intramusculaire et orale de la CSA au singe Saimiri inhibait complètement la cytoadhérence des érythrocytes infectés par Plasmodium falciparum aux cellules endothéliales du cerveau.

L'invention a donc pour objet de disposer de compositions pharmaceutiques capables d'inhiber l'adhésion d'érythrocytes infectés par des parasites malariques, plus particulièrement du type Plasmodium falciparum aux cellules endothéliales.

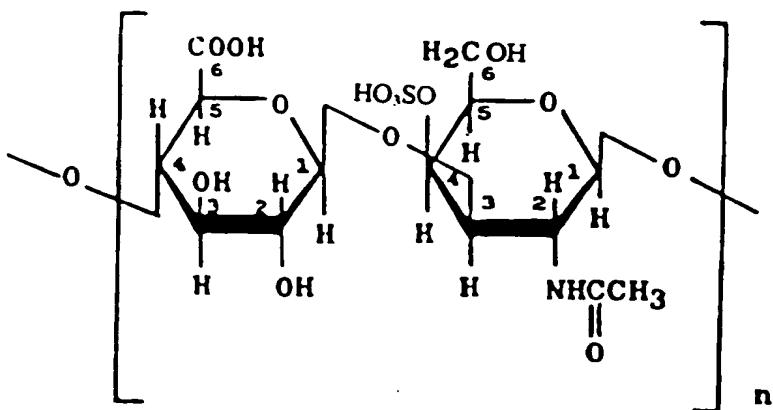
Une telle composition est caractérisée en ce qu'elle contient un agent physiologiquement actif qui entre en compétition avec un récepteur porté par les cellules endothéliales de l'hôte infectable par P.falciparum et contenant un membre de la famille des chondroïtine-glycosaminoglycans, notamment de la chondroïtine-4-sulfate, ce récepteur permettant l'adhésion d'érythrocytes, lorsque ceux-ci sont infectés par Plasmodium falciparum, à ces cellules endothéliales.

Selon un autre aspect de l'invention, la composition pharmaceutique est caractérisée en ce qu'elle contient un agent physiologiquement actif qui comprend une structure à base de chondroïtine-4-sulfate (CSA).

Il est entendu que l'expression "chondroïtine-4 sulfate", telle qu'elle est utilisée dans le présent texte, concerne à la fois l'acide chondroïtine-4 sulfurique sous ses formes acides que ses sels thérapeutiquement acceptables, notamment des sels alcalins ou alcalino-terreux, de cette forme acide.

Bien que la présence de CSA soit préférée, les inventeurs ont établi que l'inhibition de l'adhérence des érythrocytes infectés au récepteur endothérial est sans doute fonction de la charge de la molécule inhibitrice. Par conséquent, d'autres molécules fonctionnellement analogues à la CSA ayant une distribution de charge similaire au CSA peuvent également être utilisées. Il va de soi que les groupes réactifs libres, notamment hydroxyle carboxyle libres portés par les motifs saccharidiques contenus dans le groupe chondroïtine de ces chondroïtine-4 sulfates peuvent être substitués par des groupes chimiques particuliers, dès lors que ces groupes de substitution n'altèrent pas la capacité des chondroïtine-4 sulfates alors substituées à entrer en compétition avec le récepteur concerné des cellules endothéliales.

De manière préférée, l'agent actif de la composition selon l'invention est un oligomère contenant la structure :



le nombre de motifs monomères contenus dans cet oligomère étant suffisant pour empêcher la fixation de P.falciparum sur le récepteur cellulaire.

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, la composition contient au moins 90 % de CSA des chondroïtines sulfates présentes, voire même à l'état pratiquement pur. Mais cela ne constitue pas une condition essentielle.

On peut en effet également avoir recours, pour les applications thérapeutiques sus-indiquées, à des mélanges, par exemple naturels, de chondroïtine sulfates, dès lors qu'une partie au moins de ces chondroïtine sulfates seraient constitués de chondroïtine-4 sulfate. On mentionnera, à titre d'exemples, la composition à base d'acide chondroïtine sulfurique (sel de sodium) commercialisée sous la marque STRUCTUM (Dictionnaire VIDAL 1993, page 1333, Editions du VIDAL) et utilisée à ce jour en traitement d'appoint des douleurs arthrosiques.

L'invention vise également les compositions décrites ci-dessus pour le traitement ou la prévention du paludisme, plus particulièrement de complications du paludisme faisant intervenir la séquestration des parasites du paludisme, notamment de Plasmodium falciparum, de manière encore plus ciblée pour le traitement ou la prévention des accidents pernicieux induits par Plasmodium falciparum, et mettant en jeu l'adhésion des érythrocytes infectés par ce parasite à des cellules endothéliales. On sait, en effet, que ce type d'accident résulte entre autres, de phénomènes qui se rapprochent de ceux caractéristiques des tromboses et cela, plus particulièrement, au niveau de la micro-vascularisation cérébrale ou pulmonaire. Ce même type d'accident est susceptible d'être observé en d'autres localisations, par exemple, au niveau de la micro-vascularisation cardiaque.

Il appartient naturellement au clinicien d'adapter en fonction du patient les doses efficaces du principe actif, en particulier de chondroïtine-4-sulfate, qui doivent lui être administrées soit à des fins de prévention, soit à des fins curatives. A titre d'illustration seulement, on mentionnera que des intervalles appropriés de doses actives calculées sur la base de la chondroïtine-4-sulfate, administrables notamment par voie parentérale, sont de 1 à 100 mg/kg de corps, notamment de 5 à 10 mg/kg, par voie intramusculaire et ce à des fins curatives, ces doses pouvant être de 5 à 10 fois plus faibles lorsqu'elles sont administrées à des fins de prévention. Dans le cas de l'administration orale, les doses appropriées sont de l'ordre de 5 fois plus élevées que les doses correspondantes proposées ci-dessus pour les administrations par voie parentérale.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore, à l'occasion de la description des essais biologiques qui suivent.

Afin d'étudier l'effet des paramètres intervenant dans le phénomène de séquestration de Plasmodium falciparum dans le réseau microvasculaire du cerveau du singe Saimiri sciureus kariotype 14-7, on a produit deux clones d'anticorps monoclonaux interférant avec la capacité d'érythrocytes infectés par P.falciparum à adhérer à cinq clones de cellules endothéliales de microvaisseaux du cerveau de Saimiri (CECS), en mettant en oeuvre les techniques décrites dans l'état antérieur de la technique (12) (13). La capacité de ces anticorps monoclonaux, dénommés 1G11/1C7 et 4B2/1B4, et qui se sont révélés réagir de manière spécifique avec la surface des CECS, a été abolie lorsqu'ils étaient mis en contact avec des cellules endothéliales, en présence de chondroïtine-4-sulfate. Ces anticorps ont la capacité d'inhiber l'adhérence des souches parasitaires de Plasmodium falciparum, Palo-Alto (FUP)1 et IPL/BRE 1 au clone de CECS Sc 1707 (93 à 97 % d'inhibition) et, certes de façon plus variable, (4 à 77 %) avec d'autres isolats du parasite.

L'évaluation de l'adhérence des anticorps monoclonaux (ac.m) 1G11/1C7 (IgG1) et 4B2/1B4 (IgM) aux CECS a été mise en oeuvre par incubation des CECS confluantes sur lames (12 dots IFA slides) pendant 1 heure avec 1-10 µg/ml de chacun des anticorps monoclonaux. Bien que l'inhibition de l'adhérence des érythrocytes infectés en présence d'un des deux anticorps monoclonaux ait été très

efficace, la dissociation des érythrocytes infectés attachés aux CECS n'était, en général, que partielle (< 20 %), lorsqu'on les utilisait à des doses de 10 µg d'anticorps monoclonaux (ac.m.)/ml.

La réactivité des ac.m. 1G11/1C7 et 4B2/1B4 avec les CECS a été déterminée par l'appareil "FACScan" commercialisé sous la marque BECKMAN. Les intensités relatives de fluorescence de chacun des clones incubés avec les 2 ac.m. ont été mesurées. L'immunomarquage de CECS par les 2 ac.m., révélés en microscopie électronique à transmission par de l'or colloïdal, a permis de mettre en évidence la présence de leurs antigènes à la surface des membranes des cellules endothéliales, parmi les micro-villi et pseudopodes. Lorsque l'immunomarquage est pratiqué sur des CECS avec des érythrocytes infectés cytoadhérents, on observe des particules d'or exclusivement aux points de contact entre les membranes des cellules endothéliales et les protubérances (en anglais : "knobs") portées par les érythrocytes.

Afin d'analyser la nature du nouveau récepteur d'adhésion, cinq clones de CECS ont été traités avec la trypsine, mais ce traitement n'a pas aboli leur reconnaissance par 1G11/1C7 et 4B2/1B4 aux CECS. Cependant, le traitement de ces clones avec la chondroïtinase ABC (1U/ml pendant 60 mn) ou la chondroïtinase AC, mais pas avec la chondroïtinase B, ont aboli l'adhérence des érythrocytes infectés par Palo-Alto (FUP)1 et IPL/BRE1 presque complètement (86-99 %). Ce résultat montre qu'un membre de la famille des chondroïtine-glycosaminoglycanes, en l'occurrence la chondroïtine-4 sulfate (CSA), est impliquée dans l'adhésion des érythrocytes infectés aux cellules endothéliales. Il correspond au nouveau récepteur d'adhérence des érythrocytes infectés. La coincubation de 5×10^6 érythrocytes infectés/ml avec 1 mg/ml de CSA (et pas avec d'autres chondroïtine sulfates : CSB ou CSC) sur des CECS confluantes entraînait environ 50 % d'inhibition d'adhérence des érythrocytes infectés soit par Palo-Alto (FUP)1 soit par IPL/BRE1, mais n'altérait pas significativement l'adhérence des érythrocytes infectés par le clone TM 284/62 (Tableau 1). Des résultats semblables ont été obtenus avec des isolats dérivés des patients ayant un paludisme grave. Deux des six isolats montraient une cytoadhérence prononcée dépendante du CSA, de sorte qu'est établie la présence de

la molécule adhérant aux CSA à la surface des érythrocytes infectés. La présence de CSA sur les CECS a été confirmée par analyse dans l'appareil "FACScan" en utilisant l'anticorps monoclonal de souris anti-chondroïtine-4-sulfate (MAB 2030, commercialisé par Chemicon International Inc, Temecula, CA 92590) et un sérum polyclonal anti-chondroïtine-sulfate de lapin (AB 1918, commercialisé par Chemicon International Inc, Temecula, CA 92590).

Afin de déterminer que la CSA est la molécule cible des anticorps monoclonaux 1G11/1C7 et 4B2/1B4, les inventeurs ont effectué des études d'inhibition. En incubant 10 µg de 1G11/1C7 ou 4B2/1B4 avec un excès de 2 mg/ml de CSA, l'adhérence de ces anticorps à Sc 1707 (un clone de cellules endothéliales du réseau microvasculaire de cerveau de Saimiri qui n'exprimait aucun des récepteurs d'adhérence connus du parasite) était diminuée de manière significative. Il se posait ensuite la question de savoir si ces résultats avec CECS pouvaient être étendus aux cellules endothéliales humaines. A cette fin, des cellules endothéliales primo explant ont été obtenues à partir des poumons humains (CEPH). Ces cellules réagissaient avec les ac.m. 1G11/1C7 et 4B2/1B4 et avec des anticorps anti-chondroïtine-sulfate (AB 1918). Enfin, il a été possible d'inhiber de la même façon l'adhérence d'érythrocytes infectés avec Plasmodium falciparum (souches Palo-Alto/FUP1, IPL/BRE1) à ces cellules par la CSA, et par traitement avec le médicament à base de chondroïtine-4-sulfate connu sous la marque STRUCTUM (environ 80 % d'inhibition en présence pour 1 mg/ml du médicament STRUCTUM). L'inoculation des singes avec 50 mg de CSA entraînait une biodisponibilité de CSA, pendant au moins 8 heures, permettant l'inhibition (> 92 %) de l'adhérence des érythrocytes infectés aux CECS (tableaux 2 et 3).

L'invention permet ainsi l'obtention de médicaments particulièrement actifs pour prévenir ou traiter les complications neurologiques d'une infection à P.falciparum. En particulier, elle s'adresse à la prévention ou au traitement des phénomènes biochimiques pathologiques qui semblent intervenir en cascade et probablement à la suite des obstructions vasculaires dues à des hématies parasitées séquestrées.

L'invention concerne encore des associations ou combinaisons médicamenteuses faisant intervenir le CSA d'une part, et un médicament antipaludique, telle que la

quinine ou des médicaments connus sous les marques (à titre d'exemples) "CHLOROQUINE", "MEFLOQUINE", "AMODIAQUINE", etc...

Dans le cas des combinaisons, il apparaîtra immédiatement aux personnes du métier, que les deux constituants peuvent être couplés entre eux, par exemple par l'intermédiaire d'une des fonctions réactives (groupes hydroxyle ou carboxyle) portées par les groupes saccharidiques inclus dans la chondroïtine-4 sulfate et des fonctions amines portées par les médicaments antiparasitaires, du moins lorsqu'ils en comportent. On appréciera que dans ces conditions, la partie du médicament antiparasitaire contribuera à tuer les parasites libérés dans la circulation sanguine, notamment à l'occasion de l'intervention de la partie chondroïtine-4 sulfate dans la compétition entre les erythrocytes infectés et les cellules endothéliales.

L'invention n'est nullement limitée à la mise en oeuvre des compositions à base de chondroïtine-4 sulfate, à des traitements in vivo. On peut également le mettre en oeuvre à l'extérieur du corps humain, notamment pour une purification extra-corporelle du sang, pour le débarrasser des erythrocytes parasités. L'invention concerne donc également un procédé consistant à mettre en contact le sang ou un flux sanguin susceptible de contenir des erythrocytes parasités avec de la chondroïtine-4 sulfate, celle-ci étant de préférence fixée sur un support solide, telle qu'une résine appropriée, par exemple, d'un type commercialisé sous la marque SEPHADEX. Cette fixation peut être réalisée de toute façon en soi comme, par exemple, par l'intermédiaire de liaisons covalentes entre la résine et la chondroïtine-4 sulfate, étant naturellement entendu que cette liaison doit être telle qu'elle n'interfère pas avec la capacité des groupes chondroïtine-4 sulfate à fixer des erythrocytes parasités par P.falciparum ou des parasites semblables.

Tableau 1

Inhibition par le CSA de l'adhérence d'érythrocytes infectés par *P.falciparum* (IRBC) à des cellules endothéliales de cerveau de *Saimiri* (SBEC) et de cellules endothéliales de poumon humain (HLEC) prétraitées ou non avec une chondroïtinase ABC

	PRBC/mm ² témoin	% inhibition par	
		CSA	Chondroitinsase ABC
IPL/BRE1			
Sc1707	1313	66 \pm 16	99 \pm 0
Sc3A4	3859	61 \pm 21	98 \pm 1
Sc1A4	3346	53 \pm 8	91 \pm 4
Sc1D	4223	68 \pm 6	92 \pm 7
Sc93006/C2	2805	70 \pm 17	98 \pm 1
HLEC	4691	94 \pm 5	97 \pm 1
Palo-Alto(FUP)1			
Sc1707	943	82 \pm 10	99 \pm 1
Sc3A4	3105	67 \pm 22	94 \pm 4
Sc1A4	3661	58 \pm 12	91 \pm 3
Sc1D	2914	51 \pm 16	91 \pm 4
Sc93006/C2	2527	79 \pm 6	85 \pm 4
HLEC	5288	95 \pm 3	93 \pm 2
TM284/62			
Sc1707	7	73 \pm 37	45 \pm 63
Sc3A4	512	36 \pm 26	13 \pm 38
Sc1A4	817	18 \pm 36	-25 \pm 55
Sc1D	1197	30 \pm 27	-11 \pm 33
Sc93006/C2	3559	20 \pm 27	28 \pm 12
HLEC	4440	-3 \pm 29	-11 \pm 19

Inhibition de l'adhérence des IRBC à des SBEC et HLEC, quand ils sont co-incubés avec la CSA (1 μ g/ml) ou après pré-traitement des SBEC avec la chondroïtinase ABC (1U/ml pendant 60 minutes). Les résultats sont exprimés en % d'inhibition (essais en triple). L'adhérence des IRBC à l'absence de CSA ou de prétraitement avec la chondroïtinase est exprimée en IRBC fixés/mm² sur des SBEC confluentes.

Tableau 2

Inhibition de la cytoadhérence d'érythrocytes parasités par P.falciparum (IRBC), par le médicament commercialisé sous la marque "STRUCTUM"

IRBC/mm ² - Inhibition par "Structum" en % par rapport à des témoins		
Palo-Alto(FUP)1		
Sc3A4	5581	92 \pm 2
Sc1D	3771	78 \pm 6
Sc93006/C2	3510	77 \pm 7

Tableau 3

Inhibition de la cytoadhérence d'érythrocytes parasités par P.falciparum (IRBC), par la CSA biodisponible dans des sérum de singes Saimiri

	IRBC/mm ²		% Inhibition par le CSA	
	Sc34A	Sc93006/C2	Sc 34A	Sc93006/C2
TO	4861 \pm 925	2671 \pm 423		
TO + 30'	373 \pm 256	121 \pm 54	92	95
TO + 1h	342 \pm 235	129 \pm 8	93	95
TO + 2h	317 \pm 208	94 \pm 27	93	96
TO + 4h	291 \pm 31	48 \pm 26	94	98
TO + 8h	267 \pm 144	40 \pm 10	95	99

REFERENCES

1. Aikawa, M. (1988). Cerebral malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39, 3.
2. Howard, R.J. and Gilladoga, A.D. (1989) Molecular studies related to the pathogenesis of cerebral malaria. Blood. 74, 2603.
3. Sein, K.K., Brown, A.E., Maeno, Y., Smith, C.D. Corcoran, K.D., Hansukjariya, P., Webster, H.K. and Aikawa, M. (1993b). Sequestration pattern of parasitized erythrocytes in cerebrum, midbrain, and cerebellum of *Plasmodium coatneyi*-infected rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Am. J. Trop. Med. Hyg. 49, 513.
4. Sherwood, J.A., Roberts, D.D., Spitalnik, S.L., Marsh, K., Harvey, E.B., Miller, L.H. and Howard, R.J. (1989) Studies of the receptors on melanoma cells for *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40, 119.
5. Ockenhouse, C.F. and Chulay, J.D; 1988. *Plasmodium falciparum* sequestration. OKM5 antigen (CD36) mediates cytoadherence of parasitized erythrocytes to a myelomonocytes cell line. J. Infect. Dis. 157, 554.
6. Ockenhouse, C.F., Tegoshi, T. Meano, Y., Benjamin, C., Ho, M., Aikawa, M. and Lobb, R.R. (1992) Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles of ELAM-1 and VCAM-1. J. Exp. Med. 176, 1183.
7. Barnwell, J., Ockenhouse, C. and Knowles, D., (1985) Monoclonal antibody OKM5 inhibits the *in vitro* binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to monocytes, endothelial cells and C32 melanoma cells. J. Immunol. 135, 3494.
8. Berendt, A.R., Simmons, D.L., Tansey, J., Newbold, C.I. and Marsh, K. (1989) Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. Nature. 341, 57.
9. Gareth, D., Turner, H., Morrison, H., Jones, M., Davis, T.M.E., Looareesuwan, S., Buley, I.D., Gatter, K.C., Newbold, C.I., Pukritayakamee, S., Nagachinta, B., White, N.J. and Berendt, A.R. (1994). An

immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am. J. Pathol.* 145, 1057.

10. Gysin, J., Aikawa, M., Tourneur, N. and Tegoshi, T. (1992) Experimental *Plasmodium falciparum* cerebral malaria in the squirrel monkey *Saimiri sciureus*. *Exp. Parasitol.* 75, 390.

11. Gay, F., Robert, C. Pouvelle, B., Peyrol, S., Scherf, A. and Gysin, J. (1995). Isolation and characterization of brain vasculature endothelial cells from Saimiri monkeys: an in vitro model for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes cytoadherence. *J. Imm. Meth.* (in press).

12. Gysin, J., Hommel, M. and Pereira da Silva, L. (1980) Experimental infection of the squirrel monkey *Saimiri sciureus* with *Plasmodium falciparum*. *J. Parasitol.* 66, 1003.

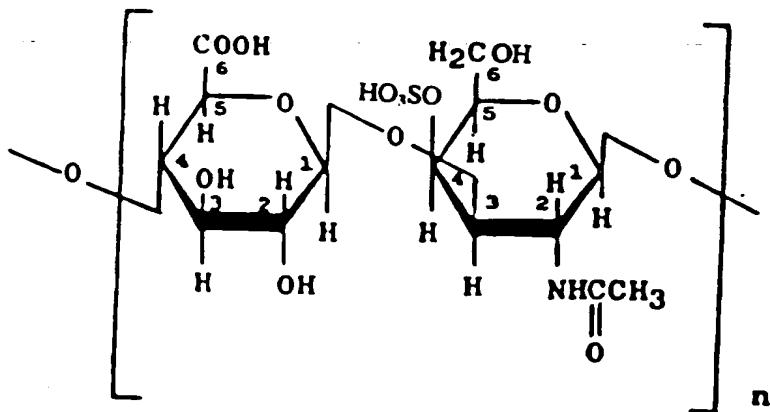
13. Gysin, J. and Fandeur, T. (1983) *Saimiri sciureus* (Karyotype 14-7) an alternative experimental model of *Plasmodium falciparum*.

14. Gysin, J. (1991) Relevance of the squirrel monkey as a model for experimental human malaria. *Res. Immunol. Inst. Pasteur.* 142, 649.

15. Muanza, K., Gay, F. Behr, C. and Scherf, A. Primary culture of human lung endothelial cells as an in vitro model for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes cytoadherence. *Infec. Immun.*
(soumis)

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique contenant au moins un véhicule pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient un agent physiologiquement actif qui entre en compétition avec un récepteur porté par les cellules endothéliales et contenant un membre de la famille des chondroïtine-glycosaminoglycans, notamment la chondroïtine-4-sulfate, ce récepteur autorisant l'adhésion à ces cellules endothéliales d'érythrocytes lorsque ceux-ci sont infectés par Plasmodium falciparum.
2. Composition pharmaceutique contenant au moins un véhicule pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient un agent physiologiquement actif qui comprend une structure à base de chondroïtine-4-sulfate.
3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'agent actif contient un oligomère de la structure :



Le nombre de motifs monomères contenus dans cet oligomère étant suffisant pour autoriser la fixation sur le susdit récepteur.

4. Composition selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce qu'elle contient au moins 90% de chondroïtine-4-sulfate par rapport aux chondroïtines sulfates présentes.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce qu'elle contient le chondroïtine-4-sulfate à l'état pratiquement pur.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'agent physiologiquement actif est constitué d'un mélange de chondroïtine-sulfates naturels contenant du chondroïtine -4 sulfate.

7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en qu'elle contient également un médicament antiparasitaire distinct, en association ou en combinaison avec les constituants chondroïtine-4 sulfate.

8. Composition selon les revendications 1 à 7 pour le traitement ou la prévention du paludisme, en particulier des complications de cette maladie qui ressortissent au neuropaludisme.

9. Composition selon la revendication 8, pour empêcher la séquestration des parasites du paludisme, notamment du Plasmodium falciparum.

10. Composition selon les revendications 1 à 9, pour le traitement ou la prévention des accidents pernicieux induits par des parasites du paludisme, notamment par P.falciparum, et mettant en jeu l'adhésion des erythrocytes infectés par ce parasite à des cellules endothéliales.

11. Utilisation d'un agent physiologiquement actif tel que défini dans les revendications 1 à 9, pour l'obtention d'un médicament destiné à une utilisation thérapeutique ou préventive du paludisme.

12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que le médicament est destiné à empêcher la séquestration des parasites du paludisme, notamment du P.falciparum.

13. Utilisation selon la revendication 11 ou la revendication 12, caractérisée en ce que le médicament est destiné à traiter ou prévenir des accidents pernicieux ou complications diverses induits par des parasites du paludisme, notamment par P.falciparum, et mettant en jeu l'adhésion des erythrocytes infectés par ce parasite à des cellules endothéliales.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/00458

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K31/725

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. CELL BIOL., vol. 117, no. 6, 1992, pages 1351-1357, XP002006596 S.J. PANCAKE ET AL.: "Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates." see the whole document ---	1,11-13
X	EXP. PARASITOL., vol. 79, no. 4, 1994, pages 506-516, XP002006597 A. ROWE ET AL.: "Plasmodium-falciparum: a family of sulfated glycoconjugates disrupts erythrocyte rosettes." see the whole document ---	1,11-13 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

25 June 1996

16.07.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaver, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 96/00458

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Week 9517 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 95-128249 XP002006601 & JP,A,07 053 388 (LION CORP.) , 28 February 1995 see abstract ---	1-3,6
X	EP,A,0 063 973 (LABORATOIRE POS) 3 November 1982 see claims ---	1-5
A	EUR. J. BIOCHEM., vol. 195, no. 3, 1991, pages 789-794, XP002006598 J.P. DALTON ET AL.: "Blocking of the receptor-mediated invasion of erythrocytes by plasmodium knowlesi malaria with sulfated polysaccharides and glycosaminoglycans." ---	
A	AM. J. TROP. MED. HYG., vol. 51, no. 2, 1994, pages 198-203, XP002006599 S.J. ROGERSON ET AL.: "Sulfated glycoconjugates as disrupters of plasmodium falciparum erythrocyte rosettes." ---	
A	Z. RHEUMATOL., vol. 39, no. 9-10, 1980, pages 314-321, XP002006600 J. SUSCHKE ET AL.: "Ueber den Einfluss von Chloroquin auf Polyanionen." ---	
A	DATABASE WPI Week 6800 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 66-09413F XP002006602 & JP,A,63 020 141 (SEIKAGAKU KENKYUSHO) see abstract -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la Internationale No

PCT/FR 96/00458

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K31/725

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J. CELL BIOL., vol. 117, no. 6, 1992, pages 1351-1357, XP002006596 S.J. PANCAKE ET AL.: "Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates." voir le document en entier ---	1,11-13
X	EXP. PARASITOL., vol. 79, no. 4, 1994, pages 506-516, XP002006597 A. ROWE ET AL.: "Plasmodium falciparum: a family of sulfated glycoconjugates disrupts erythrocyte rosettes." voir le document en entier ---	1,11-13 14 -/-

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou aider à déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 Juin 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16.07.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Klaver, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/00458

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-63973	03-11-82	FR-A- AT-T-	2503563 6588	15-10-82 15-03-84

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'International No

PCT/FR 96/00458

C. (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE WPI Week 9517 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 95-128249 XP002006601 & JP,A,07 053 388 (LION CORP.) , 28 Février 1995 voir abrégé ----	1-3,6
X	EP,A,0 063 973 (LABORATOIRE POS) 3 Novembre 1982 voir revendications ----	1-5
A	EUR. J. BIOCHEM., vol. 195, no. 3, 1991, pages 789-794, XP002006598 J.P. DALTON ET AL.: "Blocking of the receptor-mediated invasion of erythrocytes by plasmodium knowlesi malaria with sulfated polysaccharides and glycosaminoglycans." ----	
A	AM. J. TROP. MED. HYG., vol. 51, no. 2, 1994, pages 198-203, XP002006599 S.J. ROGERSON ET AL.: "Sulfated glycoconjugates as disrupters of plasmodium falciparum erythrocyte rosettes." ----	
A	Z. RHEUMATOL., vol. 39, no. 9-10, 1980, pages 314-321, XP002006600 J. SUSCHKE ET AL.: "Ueber den Einfluss von Chloroquin auf Polyanionen." ----	
A	DATABASE WPI Week 6800 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 66-09413F XP002006602 & JP,A,63 020 141 (SEIKAGAKU KENKYUSNO) voir abrégé -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à la nomenclature des familles de brevets

De l'Organisation internationale No

PCT/FR 96/00458

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-63973	03-11-82	FR-A- 2503563 AT-T- 6588	15-10-82 15-03-84